

# 皮膚や体毛の異常および角膜混濁を呈するマウス突然変異体Rim3の責任遺伝子の探索：高密度連鎖解析と物理地図の作製

著者	佐藤 肇
号	1568
発行年	1999
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/21799">http://hdl.handle.net/10097/21799</a>

氏 名（本籍）	さ 佐	とう 藤	はじめ 肇
学 位 の 種 類	博 士 （ 医 学 ）		
学 位 記 番 号	医 博 第 1 5 6 8 号		
学位授与年月日	平 成 11 年 3 月 25 日		
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
研 究 科 専 攻	東北大学大学院医学系研究科 （博士課程）外科学系専攻		
学 位 論 文 題 目	皮膚や体毛の異常および角膜混濁を呈するマウス 突然変異体 <i>Rim3</i> の責任遺伝子の探索：高密度連鎖解析と物理地図の作製		
論文審査委員	(主 査) 教授 玉 井 信 教授 成 澤 邦 明 教授 堀 井 明		

# 論文内容要旨

## 研究目的

B10.BR (R228) は、MHC クラス II 領域に存在する *Lmp2* 遺伝子に組み換えを起こしたマウスであり、マウス突然変異体 recombination-induced mutation 3 (*Rim3*) は、その B10.BR (R228) から自然発生した。*Rim3* 変異体は、これまでに報告されているマウス変異体 *Re<sup>den</sup>* (*rex* denuded) や *Bsk* (*bareskin*) と同様に皮膚や体毛の異常だけでなく角膜混濁を呈する。ヒトで皮膚と角膜に病変をきたす疾患のモデル動物として可能性のある *Rim3* 変異体の責任遺伝子の単離のために、私は、マウス亜種間戻し交配による *Rim3* 遺伝子の高密度連鎖解析を行い、それに基づく物理地図の作製を目的とした。また、*Rim3* 変異体と *Re<sup>den</sup>* 変異体を組織学的に比較検討し、主病変から考えられる遺伝子を *Rim3* 遺伝子の候補遺伝子と考え、解析することを目的とした。

## 研究結果

*Rim3* 遺伝子は、マイクロサテライトマーカーを用いた大規模な連鎖解析により、第 11 番染色体上に cross I ; (C57BL/10-*Rim3*/+ × MSM) × C57BL/10 で centromere ... *Mit145* - (0.26 cM) - *Rim3* - (0.06cM) - *Mit14,124,197* ... また cross II ; (C57BL/10 - *Rim3*/+ × JF1) × C57BL/10 で centromere ... *Mit145* - (0.30cM) - *Rim3*, *Mit14* - (0.15cM) - *Mit124* ... という順番でマップされた。*Rim3* 遺伝子に連鎖するマイクロサテライトマーカー *D11Mit145, 14, 197* を用いて Research Genetics 社の yeast artificial chromosome (YAC) genomic library をスクリーニングした結果、*Rim3* 遺伝子を含む約 550kb の YAC クローンを同定することができた。また、第 11 番染色体上のこの領域には *Rim3* 変異体と似た表現型を示すマウス変異体 *Re<sup>den</sup>*, *Bsk* が位置している。*Rim3* 変異体と *Re<sup>den</sup>* 変異体に対して組織学的解析をした結果、角膜においては、角化、角膜上皮の肥厚、実質の肥厚および実質への炎症性細胞の浸潤や血管の侵入が、皮膚においては、表皮肥厚、過角化、毛包数の減少がともに認められた。染色体上の位置情報も考慮すると、*Rim3* 遺伝子と *Re<sup>den</sup>* 遺伝子是对立遺伝子であることが示唆された。さらに、変異した *Rim3* 遺伝子の影響がいつ頃どのような細胞に現れるか発育段階を追って光顕的に観察したところ、角膜中央部の角膜上皮基底細胞は、野生型では立方体型であるのに、3 ヶ月齢の変異体では扁平化しているのが認められた。一方、皮膚では 1 週齢で変異体の表皮が肥厚しているのが認められた。この時期には毛包数の明らかな減少は認められなかった。このような組織学的解析の結果、*Rim3* 遺伝子は上皮細胞の分化および増殖に関連する遺伝子ではないかと考え、*Rim3*

遺伝子座近傍に既にマップされている遺伝子のうち、*Krt1-10*, *Krt1-12*, *Grn*, *Jup*, *Rara*, *Grb7*を*Rim3*遺伝子の候補遺伝子と考えた。*Krt1-10*, *Krt1-12*は、上皮細胞の細胞骨格を形成するケラチンをコードしていて、*Krt1-10*は、表皮の基底上細胞で、*Krt1-12*は、角膜上皮で発現している。*Grn*は、のちに *epithelin1* と *epithelin2* にプロセスされる *acrogranin* をコードしていて、*epithelin1* は、マウスの角化細胞の増殖を刺激し、*epithelin2* は、*epithelin1* によって促進される細胞増殖を抑制する作用がある。*Jup* は、上皮細胞おける接着装置の細胞内蛋白をコードしていて、細胞接着装置の減少に対する反応で表皮の肥厚がおこると考えられているので候補遺伝子とした。*Rara* は、*retinoic acid receptor alpha* をコードしている。低濃度のビタミン A 培地で表皮細胞を培養した結果、最終分化は示すが上皮細胞の移動が減少し、上皮の表面から剥離する傾向が認められなかったという報告によると、ビタミン A の作用機構の破綻でも *Rim3* 変異体の表現型がおこりうると考え、候補遺伝子とした。*Grb7* は、*epidermal growth factor receptor* に結合し *Src homology 2* ドメインを含む *growth factor receptor bound protein 7* をコードしている。連鎖解析の結果、これら6つの候補遺伝子と *Rim3* 遺伝子との間でいずれも組み換え体が存在し、これらの遺伝子は、*Rim3* 変異体の責任遺伝子から遺伝学的に除外された。

## 審 査 結 果 の 要 旨

本研究はマウス突然変異体 Rim3 の責任遺伝子のクローニングを目的とした研究であり，国立遺伝学研究所哺乳動物遺伝研究室において城石俊彦教授の指導のもとになされた。この突然変異体は同研究所のマウス飼育施設で自然発生したものであるが，皮膚と体毛の異常だけでなく角膜混濁を呈することで知られている。そのためヒトで皮膚と角膜に病変をきたす疾患のモデル動物になる可能性があるとして，Rim3 遺伝子の高密度連鎖解析を行ない，それに基づく物理地図の作成を目指したものであった。

この目的のために大規模なマウス戻し交配を行なって SSLP，SSCP，サザンブロットの手法を用いて連鎖解析を行い，それに基づき人工酵母染色体による物理地図の構築をした。その結果 Rim3 遺伝子は類似した表現型を呈するマウス変異体 *Re<sup>den</sup>* や *Bsk* がマップされている 11 番染色体の遠位部に位置すること，および *Grb7* と *Rara* の遺伝子の間に存在することを明らかにし，500kb の範囲まで狭めることに成功した。また，Rim3 の皮膚および角膜の組織学的解析を行ない，同胞の野生型と比較検討した結果，表皮および角膜上皮に病変の主座があることが推測された。上皮細胞の分化増殖に関連する蛋白をコードしている遺伝子で，すでに 11 番染色体遠位部にマップされている *Krt1-10*，*Krt1-12*，*Gnr*，*Jup* は連鎖解析の結果，Rim3 変異体の責任遺伝子でないことが示された。しかし，本研究によってマウス突然変異体 Rim3 の責任遺伝子のクローニングに向けて大きく前進し，高く評価されるもので学位に十分値するものである。審査にあたって指摘された論文作成上の変更点は十分考慮して作成されている。